製品コード RR076A

研究用

TaKaRa

One Step SYBR®
High Speed RT-PCR Kit
(Hyper-PCR™)

説明書

v201201Da

One Step SYBR® High Speed RT-PCR Kit (Hyper-PCR) は、SYBR® Green I*1 を用いたインターカレーター法専用の 1 ステップ リアルタイム RT-PCR キットです*2。
RT-PCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作が簡便でコンタミネーションの心配がありません。また、増幅産物をリアルタイムで検出でき、PCR 後に電気泳動等で確認する必要がありません。
本製品は、卓越した伸長性を示す逆転写酵素 PrimeScript II RTase と超高速 PCR 用酵素を組み合わせて、超高速リアルタイム RT-PCR 用に最適化しています。超高速反応条件での使用により、逆転写反応と PCR および融解曲線分析を 30 分以内に完了することが可能です。

＊ 1：Molecular Probes Inc. より研究用試薬として SYBR® Green I ライセンスを受けています。SYBR® は Molecular Probes Inc . の登録商標です。
＊ 2：TaqMan® プローブを用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR には使用できません。

I. 原理

One Step SYBR® High Speed RT-PCR Kit (Hyper-PCR) では、逆転写酵素 PrimeScript II RTase による RNA からの cDNA 合成と High Speed PCR Enzyme による PCR 増幅を 1 チューブ内で連続的に行います。PCR 増幅産物は、SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングします。

1. PCR
   PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。
   本製品では、High Speed PCR Enzyme を使用することにより、高速条件下での PCR が可能になります。

2. RT-PCR
   RNA は PCR 法の直接の鋳型とはなりませんが、逆転写酵素により RNA から cDNA を合成することにより、PCR 法を RNA 解析に応用することが可能になります。これが、RT-PCR 法であり、高感度な RNA 検出方法です。
   本製品では、1 ステップ RT-PCR を行います（図 1）。

   1 ステップ RT-PCR では、PCR 用の Specific Primer（Reverse）を用いて逆転写反応を行い、合成された cDNA を鋳型として Specific Primer（Forward, Reverse）による PCR 増幅を行います。（Random Primer および Oligo dT Primer を逆転写反応に用いることはできません。）

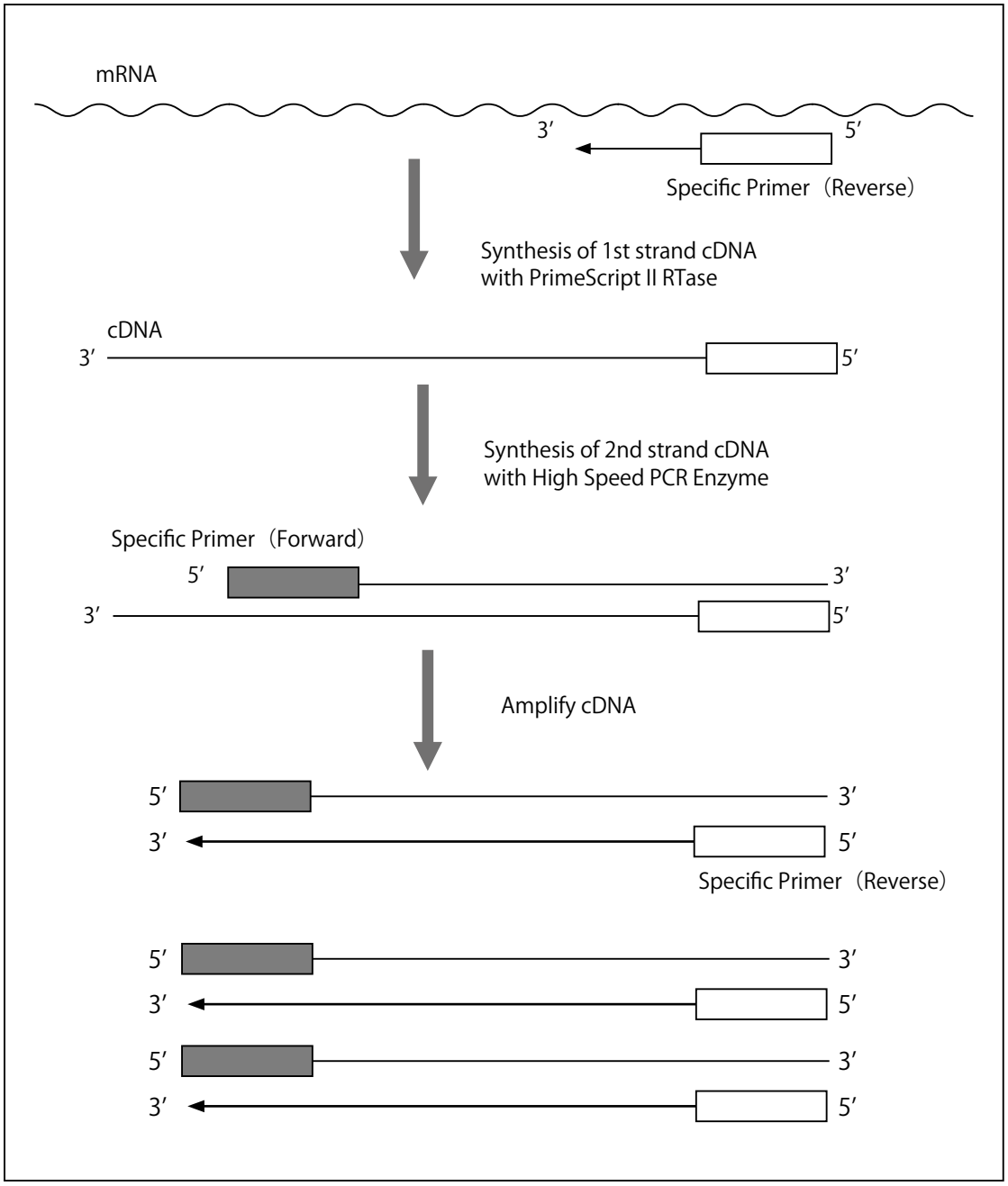


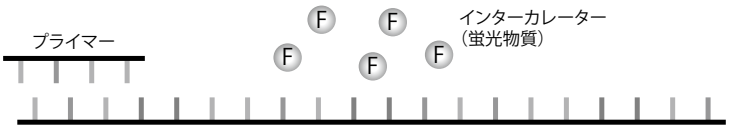
図 1. One Step SYBR® High Speed RT-PCR Kit (Hyper-PCR) の反応

3. 蛍光検出法

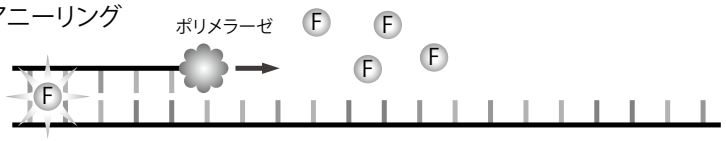
インターカレーター法：

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

1）熱変性



2）プライマーのアニーリング



3）伸長反応

II. キットの内容（100 反応分；25 μl 反応系）

1.	PrimeScript II RT Enzyme Mix＊1	50 μl
2.	High Speed PCR Enzyme	150 μl
3.	5 × One Step High Speed Buffer＊2	500 μl
4.	dNTP Mixture (10 mM each)	50 μl
5.	250 × SYBR® Green I	40 μl
6.	RNase Free dH_2O	1 ml×2 本

＊1：逆転写酵素および RNase Inhibitor を含む
＊2：Mg^{2+} を含む

キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊：PCR 用プライマーの設計方法は、「VIII. B. プライマー設計について」をご参照ください。

III. 保存

－ 20℃
250 × SYBR® Green I は、**遮光して**－ 20℃保存すること。

IV. 特長

（1） 超高速条件下での反応が可能。

（2） コンタミネーションリスクを軽減する 1 ステップ反応。

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 反応液は、数回～ 10 回分程度をまとめて Master Mix（RNase Free dH_2O、バッファー、酵素等の混液）を調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の調製を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

（2） PrimeScript II RT Enzyme Mix、High Speed PCR Enzyme は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。これらの酵素類は使用直前まで－ 20℃で保存し、使用後は直ちに－ 20℃に保存してください。

（3） 5 × One Step High Speed Buffer は、使用前によく Vortex 等で混合した後、軽く遠心してください。

（4） 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

（5） 本キットによる逆転写反応には、遺伝子特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

VI. 操作

（RNA 調製方法は VIII. A RNA サンプル調製についてを参照してください。）

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量
5 × One Step High Speed Buffer	5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 μl
Forward primer (20 μM)	0.5 μl
Reverse primer (20 μM)	0.5 μl
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μl
High Speed PCR Enzyme	1.5 μl
SYBR® Green I 希釈液（用時調製）＊ 1	1 μl
template ＊ 2	1 μl
RNase Free dH_2O	14.5 μl
total	25 μl

＊ 1：250 × SYBR® Green I を RNase Free dH_2O で 10 倍希釈する。
例：250 × SYBR® Green I 2 μl + RNase Free dH_2O 18 μl
＊ 2：total RNA は 20 pg ～ 20 ng を templete として使用することが望ましい。

2. 反応液を軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。

Stage1：逆転写反応
45℃ 1 分
95℃ 1 分

Stage2：3 Step PCR
98℃ X 秒＊1
55℃＊2 Y 秒＊1
68℃ Z 秒＊1
] 40 ～ 50 サイクル

あるいは

Stage2：2 Step PCR
98℃ X 秒＊1
60℃＊2 Y 秒＊1
] 40 ～ 50 サイクル

Stage3：融解曲線分析

＊ 1：お手持ちのリアルタイム PCR 装置の最速条件でお試しください。
＊ 2：まずこの温度で試し、必要があれば至適化してください。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、お手持ちのリアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

VII. 反応例

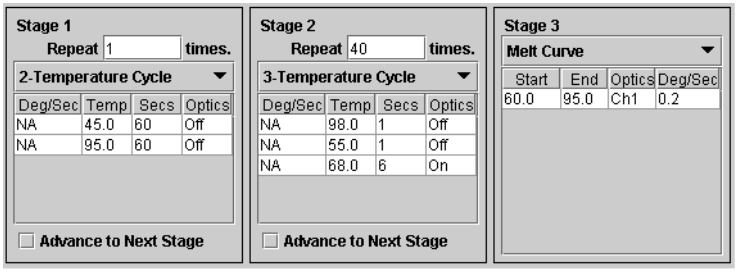
【Smart Cycler® II System を用いた場合の反応例】

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。
＜1 反応あたり＞

試薬	使用量
5 × One Step High Speed Buffer	5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 μl
Ywhaz-F primer (20 μM) ＊1	0.5 μl
Ywhaz-R primer (20 μM) ＊1	0.5 μl
PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μl
High Speed PCR Enzyme	1.5 μl
SYBR® Green I 希釈液	1 μl
template ＊2	2 μl
RNase Free dH_2O	13.5 μl
total	25 μl

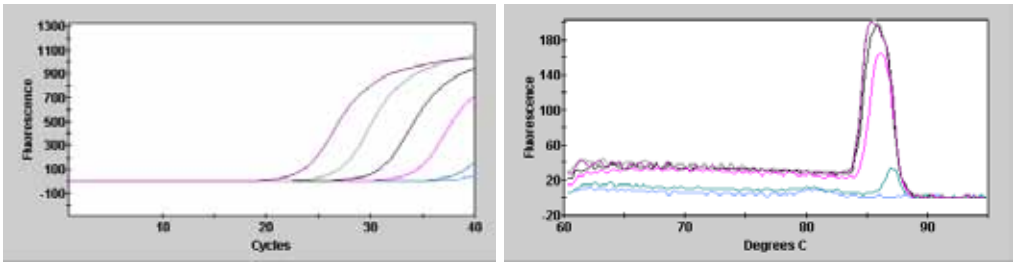
＊1：当社の【Perfect Real Time サポートシステム】の Primer を使用。
＊2：Mouse heart total RNA (1 pg/μl, 10 pg/μl, 100 pg/μl, 1 ng/μl, 10 ng/μl) を使用。

2. 反応チューブを Smart Cycler® 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® にセットし、反応を開始する。



Stage1 ; 逆転写反応
45℃ 1 分
95℃ 1 分
Stage2 ; PCR 反応
Repeat ; 40 cycles
98℃ 1 秒
55℃ 1 秒
68℃ 6 秒
Stage3 ; Melt Curve

【結果】



増幅曲線　　増解曲線

図 2　Smart Smart Cycler® II System での解析結果

VIII. Appendix

A. RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには純度の高い RNA サンプルを得ることが大切です。そのためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

［器具］

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の（1）あるいは（2）を行ってから使用してください。

（1） 乾熱滅菌（180℃ 60 分）

（2） ガラス器具を 0.1%ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で、37℃ 12 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃ , 30 分）する。
RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

［溶液］

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌（180℃ 60 分）あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

［RNA サンプルの調製法］

RT-PCR 法に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば高純度に精製した RNA を使用することをお勧めします。
培養細胞や組織サンプルからの高純度 total RNA の調製には、スピンカラムタイプの NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10/.50/.250）や AGPC 法の簡便化試薬である RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）が便利です。

B. プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能）

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと Tm 値の計算は、専用のソフトウエアで行う OLIGO＊1：63 ～ 68℃ Primer3＊2：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3′ 末端） T/C の連続（polypyrimidine）は避ける A/G の連続（polypurine）は避ける
3′ 末端配列	3′ 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける 3′ 末端塩基は、G または C が望ましい 3′ 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける プライマー 3′ 末端が 2 base 以上相補する配列を避ける
特異性	BLAST 検索でプラマーの特異性を確認する＊3

＊ 1：OLIGO Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊ 2：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊ 3：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

＊：当社の [Perfect Real Time サポートシステム] は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子の発現解析のためのリアルタイム RT-PCR 用プライマーを、オンライン検索＆ご注文いただけるシステムです。
本システムのプライマーは、リアルタイム PCR に SYBR® P*remix Ex Taq* II（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR820A/B）または SYBR® P*remix Ex Taq*（Tli RNaseH Plus）（製品コード RR420A/B）を用いる 2 ステップリアルタイム RT-PCR の系に最適化されていますが、本キットを用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR にもご利用いただけます。
ただ、プライマーによっては 1 ステップの系では十分に性能を発揮できない場合がありますので、その場合には上記キットを用いる 2 ステップリアルタイム RT-PCR をお試しください。

IX. 関連製品

One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit（Perfect Real Time）(製品コード RR066A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II（Perfect Real Time）(製品コード RR086A/B）
One Step PrimeScript® RT-PCR Kit（Perfect Real Time）(製品コード RR064A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Tli RNaseH Plus）(製品コード RR820A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™（Tli RNaseH Plus）(製品コード RR420A/B）
SYBR® Premix DimerEraser®（Perfect Real Time）(製品コード RR091A/B）
Premix Ex Taq™（Probe qPCR）(製品コード RR390A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900）
Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）
RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.10/.50/.250）
EASY Dilution (for Real Time PCR)（製品コード 9160）

X. 参考文献

1）Hyper-PCR とは
   a) Fujimoto T, Konagaya M, Enomot M, Tsuboi K, Hashimoto K, Taniguchi K, Kodama T, Okabe N. (2010) *Japanese journal of infectious diseases*, **63**, 31-35
   b) 藤本嗣人（2009）臨床と微生物　高速 PCR システムによるアデノウイルス診断、**36-3**, 73-78
1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ　4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

XI. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・SYBR® は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[P5] PCR Notice
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社